

# **Az autofágia kapcsolata a sejt más lebontó rendszereivel: a Rab11 fehérje szerepének vizsgálata**

Doktori értekezés tézisei

**Szatmári Zsuzsanna**

Biológia Doktori Iskola, iskolavezető: Prof. Erdei Anna  
Molekuláris Sejt- és Neurobiológia Doktori Program, programvezető: Prof. Sass Miklós  
Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar



Témavezető: Prof. Sass Miklós

Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar  
Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék  
Budapest, 2014

## Bevezetés

A makroautofágia (a későbbiekben röviden csak autofágia) az eukarióta sejtek evolúciósan konzervált lebontó útvonala. A folyamat során a hibás, előregedett sejtalkotók és a citoplazma egyes részletei a folyamatot fémjelző, kettős membránnal határolt autofagoszómákba csomagolódnak. Az autofagoszómák lizoszómákkal történő fúziója eredményeképpen kialakul az autolizoszóma, melynek savas pH-n működő emésztőenzimeik degradálják a lumen tartalmát, és alapanyagot szolgáltatnak a sejt anabolikus és energiatermelő folyamatai számára.

Az autofágia molekuláris hátterét eredetileg sörélesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) sejtekben írták le. Mára azonban köztudottá vált, hogy az autofágia stresszhatásokra és patológiás helyzetekre adott citoprotektív válaszként a többsejtű eukarióta szervezetekben is kiemelten fontos. Szerepét számos ismert humán betegségben is igazolták (Mizushima és mtsai, 2008). Az autofágia alulműködésének következtében a sejtekben felhalmozódnak a hibás vagy előregedett organellek, illetve a nem megfelelő konformációjú, aggregációra hajlamos fehérjék, ami különböző neurodegenerációs betegségek – például Alzheimer-kór vagy Parkinson-kór – kialakulásához vezethet. A működésképtelen mitokondriumok eltávolításával az autofágia az oxidatív stresszt és ezzel együtt a tumorprogressziót elősegítő mutációk kialakulásának valószínűségét is csökkenti.

Mindezek alapján nyilvánvaló, hogy az autofágia molekuláris részleteinek, szabályozásának felderítése időszerű és szükséges. Kiemelten fontos, hogy megismerjük az autofágia szerepét a különböző fiziológiai folyamatokban és patológiás elváltozásokban, hiszen ez a jövőben további terápiás célpontok azonosítását, illetve új, célzottabb kezelések kidolgozását teszi lehetővé.

Az autofagoszómák érési folyamatuk során nemcsak lizoszómákkal fuzionálhatnak, hanem az endoszomális rendszer különböző tagjaival is. Az autofagoszómák és endoszómák összeolvadásával hibrid organellek, úgynevezett amfiszómák alakulnak ki, melyek a későbbiekben önmaguk is fuzionálnak lizoszómákkal, így tartalmuk lebontásra kerül. Az autofagoszóma-érés és amfiszóma-képződés folyamatának pontos tér- és időbeli szabályozását, illetve a fúziós események pontos molekuláris mechanizmusát illetően

azonban számos nyitott kérdés maradt. Nemrégiben az is fölmerült, hogy létezhet valamilyen molekuláris közvetítő folyamat az autofág és endoszomális útvonalak között, amely lehetővé teszi a két folyamat összehangolt finomszabályozását (Lamb és mtsai, 2013), azonban erre eddig nem találtak kísérletes bizonyítékot.

A Rab11 a Rabok (Ras-típusú kis G-fehérjék) családjába tartozik; ezek a GTPázok a membránszállítás és -fúzió folyamatainak legfőbb szabályozói (Stenmark, 2009). A Rab11 fontos szerepet tölt be az endoszomális útvonalban, széles körben használják a reciklizáló endoszómák markereként (Hsu és Prekeris, 2010). Emellett a fehérje funkciója szükséges lehet az autofágia folyamatának különböző lépéseiben is. Korábbi, emlős sejtenyészeten kivitelezett tanulmányok szerint a Rab11 szerepet játszhat az autofágia érési szakaszában (Fader és mtsai, 2008; Richards és mtsai, 2011). Más eredmények viszont arra utalnak, hogy a Rab11 az autofagoszóma kezdeti lépéseinél, az izoláló membrán (fagofór) növekedésének szakaszában nélkülözhetetlen (Longatti és mtsai, 2012; Knævelsrud és mtsai, 2013).

Ezek alapján elképzelhető, hogy a Rab11 részt vesz az autofág és endoszomális útvonalak szabályozásának összehangolásában. Mivel azonban az autofágiában betöltött szerepe az irodalmi adatok alapján nem bizonyult egyértelműnek, azt tűztük ki célul, hogy megvizsgáljuk a fehérje funkcióját egy, az autofágia és endocitózis folyamatának tanulmányozására egyaránt alkalmas *in vivo* modellrendszerben, az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) lárvális zsírtestjében.

## Alkalmazott módszerek

- **Mutánsok, transzgénikus állatok, genetika.** A széles körben alkalmazott *ecetmuslica* modellrendszer egyik előnye, hogy kifinomult genetikai eszköztárának segítségével gyorsan és egyszerűen megközelíthető az egyes sejtélettani folyamatok genetikai háttere. Vizsgálataink során különböző mutációk és transzgén-konstrukciók (fluoreszcens riporterek, fehérje-túltermelés, RNS interferenciával történő géncsendesítés) számos kombinációjával vizsgáltuk a Rab11 és kötőpartner, a Hook autofágiában betöltött szerepét.
- **Rekombináns DNS technológia.** A fehérjék fizikai kapcsolatának vizsgálata, illetve transzgénikus *Drosophila* törzsek előállítása céljából több plazmid alapú konstrukciót is létrehoztunk.
- **Sejttenyésztés, ko-immunprecipitáció.** A különböző fehérjék fizikai interakciójának vizsgálatát, illetve a kötőhely-térképezést *Drosophila* D.Mel-2 sejttenyészetben végeztük, ko-immunprecipitációs technika segítségével.
- **Western blot és lokalizációs vizsgálatok.** A ko-immunprecipitációs vizsgálatokból származó minták, illetve az egész lárvából vagy lárvális zsírtestből készült homogenizátumok fehérjetartalmát Western blot módszerrel elemeztük. Az egyes fehérjék sejten belüli lokalizációjának vizsgálatára fluoreszcens riporterral fuzionált rekombináns fehérjéket és/vagy immunhisztokémiai eljárást alkalmaztunk.
- **Egyéb szövetfestési eljárások.** Vizsgálataink során felhasználtunk az élő sejtek egyes alkotóit specifikusan kimutató vitális festékeket, illetve a sejtek által felvett endocitotikus jelölőanyagokat is.
- **Mikroszkópia.** A reporterfehérjék jelenlétét és szövetfestési eljárásaink eredményeit fluoreszcens mikroszkóp segítségével detektáltuk. A sejtek ultrastrukturális szerkezetét elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.
- **Az adatok statisztikai elemzése.** Vizsgálataink eredményeit minden esetben kvantifikáltuk, és adatainkat a megfelelő statisztikai eljárás segítségével elemeztük.

## Eredmények, tézisek

1. Három független, RNS interferencia indukálására alkalmas transzgén és egy hipomorf mutáció, valamint a domináns negatív fehérjeforma túltermelése által okozott fenotípus vizsgálatával kimutattuk, hogy a Rab11 részt vesz az autofágiában. A működőképes fehérje jelenléte szükségesnek bizonyult az autofágia zavartalan lefolyásához.
2. Több különböző módszerrel – fluoreszcens riporterek sejten belüli eloszlásának vizsgálata, immunhisztokémiai eljárások, Western blot, elektronmikroszkópia – is kimutattuk, hogy a Rab11 szükséges az autofagoszómák érési folyamatához. A fehérje hiányában az autofág lebontás elégtelen működését, illetve éretlen és abnormális szerkezetű autofagoszómák felhalmozódását figyelhettük meg.
3. Számos fluoreszcens riporter, endogén fehérje és vitális festék sejten belüli mintázatának, valamint a Rab11-csendesített sejtek ultrastruktúrájának vizsgálata azt mutatta, hogy Rab11 hiányában a zsírtestsejtekben elsavasodott késői endoszómák halmozódnak föl.
4. Az autofág struktúrák és az endosomális útvonal különböző markereinek kolokalizációját vizsgálva kimutattuk, hogy a Rab11 nélkülözhetetlen az autofagoszómák késői endoszómákkal történő fúziójához, azaz az amfiszóma-képződés folyamatához.
5. Különböző fluoreszcens riporterek és endogén fehérjék kolokalizációs vizsgálatai azt mutatták, hogy a Rab11 autofágia-indukció hatására a reciklizáló endoszómákról autofagoszómákra helyeződik át.
6. *Drosophila* sejtenyészetben és egész állaton kivitelezett ko-immunprecipitációs vizsgálataink alapján bebizonyítottuk, hogy a Rab11 fizikai interakcióba lép az endoszóma-érés egyik ismert szabályozójával, a Hook fehérjével.

7. Megvizsgáltuk többféle autofág és endoszomális marker eloszlását a *hook* mutáns lárvák zsírtestsejtjeiben. Azt tapasztaltuk, hogy - a Rab11-hez hasonlóan - a Hook fehérje is szükséges az amfiszóma-képződéshez, azonban a Hook hiánya nem vezet késői endoszómák felhalmozódásához.
8. Kolokalizációs vizsgálatokkal kimutattuk, hogy éheztetéssel történő autofágia-indukciót követően a Hook a késői endoszómákról Rab11-függő módon autofág struktúrára helyeződik át, és ez teszi lehetővé a késői endoszómák érési folyamatának befejeződését.
9. Igazoltuk, hogy a Hook homodimerizációért felelős coiled-coil doménje szolgál kötőhelyül a Rab11 számára. Az éheztetéssel indukált autofágia során a Rab11 jelenléte csökkenti a homodimer formában előforduló Hook fehérjék mennyiségét; ennek oka valószínűleg az, hogy az éheztetés hatására a Hook inkább a Rab11-gyel képez heterodimert.
10. Ko-immunprecipitációs vizsgálataink azt mutatták, hogy a Hook fehérje N-terminálisán keresztül képes fizikai kapcsolatot létesíteni a mikrotubulusok szerkezeti elemével, az  $\alpha$ -tubulinnal.
11. Megfigyeltük, hogy míg a teljes hosszúságú Hook fehérje túltermelése - a Rab11 hiányához hasonlóan - az autofágia és endoszóma-érés folyamatainak defektusát okozta a lárvális zsírtest sejtjeiben, az N-terminálisan csonkolt Hook fehérje túltermelésének nem volt ilyen hatása.
12. Fenti eredményeink együttesen azt sugallják, hogy autofágia-indukció hatására a Rab11 eltávolítja a késői endoszómákról a Hookot. Valószínű, hogy kölcsönhatásukon keresztül a Rab11 gátolja a Hook endoszóma-érésre gyakorolt gátló hatását, így módon segítve elő az endoszómák érési folyamatát és az autofagoszómákkal történő fúzióját.
13. Kimutattuk azt is, hogy a proteaszomális lebontás gátlása a sejtméret csökkenéséhez és megnövekedett autofág aktivitáshoz vezet a lárvális zsírtest sejtjeiben.

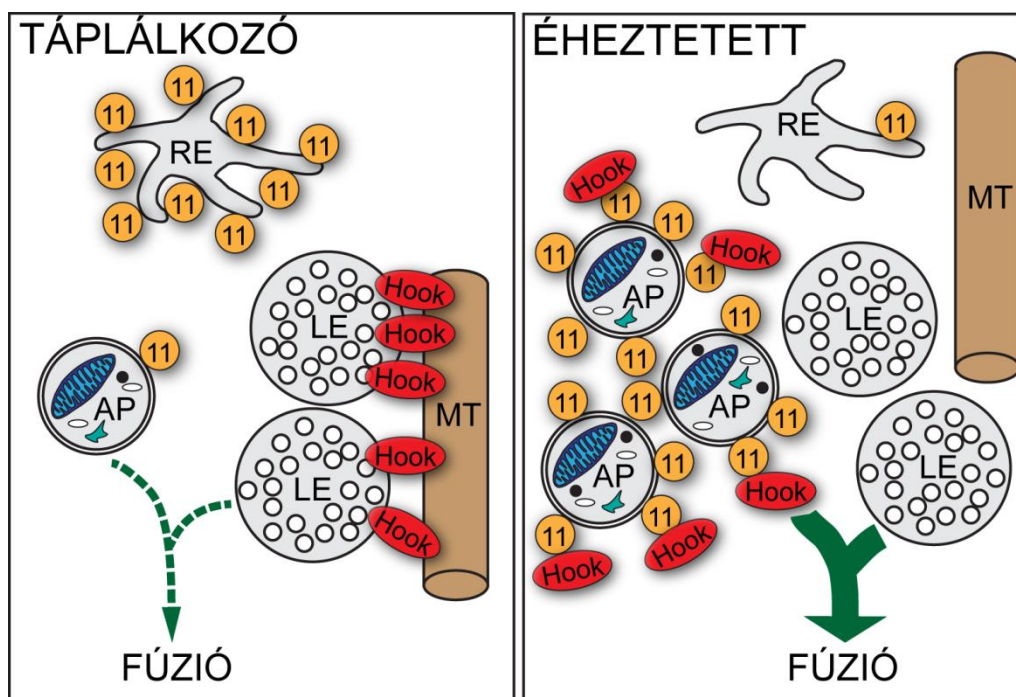
## Az eredmények megvitatása

Ahogy azt korábbi munkák szemléltették, az érett késői endoszómák képesek autofagoszómákkal összeolvadni, ezzel elősegítve azok érési folyamatát (Köchl és mtsai, 2006; Filimonenko és mtsai, 2007). Eredményeink két előző tanulmánnyal (Fader és mtsai, 2008; Richards és mtsai, 2011) összhangban azt mutatják, hogy a Rab11 fehérje szükséges az autofagoszómák éréséhez. A fehérje hiánya éretlen autofagoszómák és késői endoszómák felhalmozódásához vezetett, valószínűleg az összeolvadásukkal bekövetkező amfiszóma-képződés elmaradása miatt.

Megfigyeltük továbbá, hogy autofágia-indukciót követően a Rab11 fehérje reciklizáló endoszómákról autofagoszómákra helyeződik át. Ez az eredményünk összhangban van azokkal a korábbi tanulmányokkal, melyek kimutatták, hogy a reciklizáló endoszómák (RE) membránforrásként szolgálnak a formálódó autofagoszómák számára, és emlőssejtekben, valamint ecetmuslicában a Rab11 részt vesz az RE-kről az autofagoszómák képződési helyére történő vezikula-szállításban (Longatti és mtsai, 2012; Puri és mtsai, 2013; Knævelsrud és mtsai, 2013). Míg azonban ezek a munkák azt igazolják, hogy a Rab11 nélkülözhetetlen az autofagoszómák kialakulásához, mi a vizsgálatainkban nem tapasztaltuk az autofágia korai lépéseinek zavarát. Erre magyarázatot adhatnak azok a megfigyelések, melyek szerint az autofagoszóma membránja sejtípustól függően eltérő forrásokból származhat (Mari és mtsai, 2011). Elképzelhető, hogy a *Drosophila* esetében a reciklizáló endoszómák ugyan részt vesznek a folyamatban, de mégsem ők jelentik az autofágia legfőbb membránforrását.

További eredményeink betekintést nyújtanak az autofagoszómák és endoszómák érésének egy érdekes mozzanatába. A Hook és a Rab11 fizikai kapcsolata mindkét útvonal érési lépéseire egyformán szükséges. Egy korábbi tanulmány kimutatta, hogy a Hook negatívan szabályozza az endoszómák érését (Narayanan és mtsai, 2000). Ezzel a munkával összhangban azt találtuk, hogy a teljes hosszúságú Hook fehérje túltermelése a Rab11-csendesítéshez nagyon hasonló változást okoz a különböző endocitózis- és autofágia-markerek sejten belüli mintázatában. Azt is sikerült kimutatnunk, hogy a Hook mikrotubulus kötő N-terminusa szükséges a fenti negatív szabályozó hatás kifejtéséhez.

Eredményeink együttesen azt támasztják alá, hogy a Rab11 kulcsszerepet játszik a Hook késői endoszómákról történő eltávolításában, és ez az a lépés, ami lehetővé teszi az endoszómák érését és lizoszómákkal való fúzióját. Korábbi ismeretek és saját eredményeink alapján kidolgoztunk egy modellt, amely egy, az endoszomális és autofág útvonalak között közvetítő mechanizmus létét feltételezi (1. ábra). Elméletünk a következő: mivel éheztetés során a felerősödő autofágia-indukció hatására nagyobb számban keletkeznek autofagoszómák, az autofágia további érési lépéseire az endo-lizoszomális bemenet növekedése szükséges. Ezt biztosítja a Rab11 azáltal, hogy eltávolítja a Hook-ot a késői endoszómákról, amivel lehetővé teszi érésüket és autofagoszómákkal való fúziójukat.



**1. ábra. A Rab11 és a Hook autofágiában betöltött szerepét bemutató sematikus ábra.** RE: reciklizáló endoszóma, LE: késői endoszóma, AP: autofagoszóma, MT: mikrotubulus, 11: Rab11.

Eredményeink alapján tehát úgy tűnik, hogy a Rab11 molekuláris közvetítőként szerepel az autofág és endoszomális útvonalak között, így egyike lehet azoknak a fehérjéknek, amelyek lehetővé teszik a két folyamat összehangolt működését. A jelenség orvosi biológiai fontossága nyilvánvalóan szükségessé teszi a résztvevő molekulák és szabályozó mechanizmusok további vizsgálatát és felderítését.



## A tézis alapjául szolgáló közlemények

**Szatmári, Z.**, V. Kis, M. Lippai, K. Hegedus, T. Faragó, P. Lorincz, T. Tanaka, G. Juhász, és M. Sass. 2013. Rab11 facilitates crosstalk between autophagy and endosomal pathway through regulation of Hook localization. *Mol. Biol. Cell.* doi:10.1091/mbc.E13-10-0574.

Lőw, P., Á. Varga, K. Pircs, P. Nagy, **Z. Szatmári**, M. Sass, és G. Juhász. 2013. Impaired proteasomal degradation enhances autophagy via hypoxia signaling in *Drosophila*. *BMC Cell Biol.* 14:29. doi:10.1186/1471-2121-14-29.

## Felhasznált irodalom

- Fader, C.M., D.G. Sánchez, M. Furlán, és M.I. Colombo. 2008. Induction of autophagy promotes fusion of multivesicular bodies with autophagic vacuoles in k562 cells. *Traffic*. 9:230–50. doi:10.1111/j.1600-0854.2007.00677.x.
- Filimonenko, M., S. Stuffers, C. Raiborg, A. Yamamoto, L. Malerød, E.M.C. Fisher, A.M. Isaacs, A. Brech, H. Stenmark, és A. Simonsen. 2007. Functional multivesicular bodies are required for autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease. *J. Cell Biol.* 179:485–500. doi:10.1083/jcb.200702115.
- Hsu, V.W., és R. Prekeris. 2010. Transport at the recycling endosome. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22:528–34. doi:10.1016/j.ceb.2010.05.008.
- Knævelsrud, H., K. Sjøreng, C. Raiborg, K. Håberg, F. Rasmuson, A. Brech, K. Liestøl, T.E. Rusten, H. Stenmark, T.P. Neufeld, S.R. Carlsson, és A. Simonsen. 2013. Membrane remodeling by the PX-BAR protein SNX18 promotes autophagosome formation. *J. Cell Biol.* 202:331–49. doi:10.1083/jcb.201205129.
- Köchl, R., X.W. Hu, E.Y.W. Chan, és S.A. Tooze. 2006. Microtubules facilitate autophagosome formation and fusion of autophagosomes with endosomes. *Traffic*. 7:129–45. doi:10.1111/j.1600-0854.2005.00368.x.
- Lamb, C.A., H.C. Dooley, és S.A. Tooze. 2013. Endocytosis and autophagy: Shared machinery for degradation. *Bioessays*. 35:34–45. doi:10.1002/bies.201200130.
- Longatti, A., C.A. Lamb, M. Razi, S. Yoshimura, F.A. Barr, és S.A. Tooze. 2012. TBC1D14 regulates autophagosome formation via Rab11- and ULK1-positive recycling endosomes. *J. Cell Biol.* 197:659–75. doi:10.1083/jcb.201111079.
- Mari, M., S.A. Tooze, és F. Reggiori. 2011. The puzzling origin of the autophagosomal membrane. *F1000 Biol. Rep.* 3:25. doi:10.3410/B3-25.
- Mizushima, N., B. Levine, A.M. Cuervo, és D.J. Klionsky. 2008. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*. 451:1069–75. doi:10.1038/nature06639.
- Narayanan, R., H. Krämer, és M. Ramaswami. 2000. Drosophila endosomal proteins hook and deep orange regulate synapse size but not synaptic vesicle recycling. *J. Neurobiol.* 45:105–19.
- Puri, C., M. Renna, C.F. Bento, K. Moreau, és D.C. Rubinsztein. 2013. Diverse autophagosome membrane sources coalesce in recycling endosomes. *Cell*. 154:1285–99. doi:10.1016/j.cell.2013.08.044.
- Richards, P., C. Didszun, S. Campesan, A. Simpson, B. Horley, K.W. Young, P. Glynn, K. Cain, C.P. Kyriacou, F. Giorgini, és P. Nicotera. 2011. Dendritic spine loss and neurodegeneration is rescued by Rab11 in models of Huntington's disease. *Cell Death Differ.* 18:191–200. doi:10.1038/cdd.2010.127.
- Stenmark, H. 2009. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10:513–25. doi:10.1038/nrm2728.